



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 9/10, C12P 19/18, C12N 1/13 // (C12N 9/10, C12R 1:89)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/18893 (43) Date de publication internationale: 6 avril 2000 (06.04.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02261 (22) Date de dépôt international: 23 septembre 1999 (23.09.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/12051 25 septembre 1998 (25.09.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ROQUETTE FRERES [FR/FR]; F-62136 Lestrem (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FLECHE, Guy [FR/FR]; 15, rue Gambetta, F-59190 Hazebrouck (FR). LOOTEN, Philippe [FR/FR]; 66, allée de l'Artois, Parc de la Carnoy, F-59130 Lambersart (FR). HEYSEN, Arnaud [FR/FR]; 203, voie Delattre, F-62350 Saint Floris (FR). BALL, Steven [FR/FR]; 58, rue Molhant, F-59830 Bourghelles (FR). (74) Mandataires: BOULINGUIEZ, Didier etc.; Cabinet Plasser- aud, 84, rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR PREPARING A MIXTURE OF STARCH BRANCHING ENZYMES EXTRACTED FROM ALGAE (54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION D'UN MELANGE D'ENZYMES DE BRANCHEMENT DE L'AMIDON EXTRAITES D'ALGUES (57) Abstract <p>The invention concerns a method for obtaining a mixture of starch branching enzymes extracted from unicellular algae characterised in that it consists in modifying a unicellular algae such that it no longer expresses a starch debranching activity; in treating said modified unicellular algae so as to obtain a concentrated acellular extract; and in subjecting said concentrated acellular extract to molecular sieving so as to obtain a mixture of starch branching enzymes extracted from algae.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne un procédé d'obtention d'un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires caractérisé par le fait que l'on modifie une algue unicellulaire de manière à ce qu'elle n'exprime plus d'activité débranchante de l'amidon, traite cette algue unicellulaire modifiée de manière à obtenir un extrait a-cellulaire concentré, et effectue un tamisage moléculaire de cet extrait a-cellulaire concentré de manière à obtenir ledit mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE PREPARATION D'UN MELANGE D'ENZYMES DE
BRANCHEMENT DE L'AMIDON EXTRAITES D'ALGUES

La présente invention est relative à un procédé de
préparation d'un mélange d'enzymes de branchement de
5 l'amidon extraites d'algues unicellulaires.

La présente invention a également pour objet un procédé
de modification de l'amidon et de ses dérivés mettant en
oeuvre ledit mélange, ainsi que l'amidon et les dérivés
d'amidon modifiés ainsi obtenus.

10 On entend par "amidon", au sens de la présente
invention, l'amidon naturel ou hybride issu de pomme de
terre, de pomme de terre à haute teneur à amylopectine
(féculé waxy), de maïs, de blé, de maïs à haute teneur en
amylopectine (maïs waxy), de maïs à haute teneur en amylose,
15 de riz, de pois ou de manioc, les coupes ou fractions qui
peuvent être faites ou obtenues des amidons, telles que
l'amylose, l'amylopectine, les coupes granulométriques
connues de l'homme de l'art sous les vocables d'amidon de
blé "A" et amidon de blé "B", et les mélanges
20 quelconques d'au moins deux quelconques des produits
susmentionnés.

Au sens de l'invention, on entend en particulier par
"dérivés d'amidon", l'ensemble des amidons modifiés issus
de la modification enzymatique, chimique et/ou physique, en
25 une ou plusieurs étapes, de cet amidon.

Les dérivés d'amidon peuvent notamment être les amidons
modifiés par l'une au moins des techniques connues
d'éthérification, d'estérification, de réticulation,
d'oxydation, de traitement alcalin, d'hydrolyse acide et/ou
30 enzymatique.

La présente invention concerne également une
composition enzymatique contenant des enzymes de branchement
de l'amidon extraites d'algues unicellulaires,

significativement appauvrie en enzymes à activité amylasique et débranchante de l'amidon.

Habituellement, les sources les plus importantes et les plus variées d'enzymes de branchement, encore appelées enzymes de ramification, se trouvent chez les plantes où elles participent à l'édification du polymère de réserve qu'est l'amidon. Ces enzymes sont plus particulièrement impliquées dans la synthèse de la fraction ramifiée de l'amidon, l'amylopectine, et dans la synthèse des quelques points de branchement de la fraction linéaire de l'amidon, l'amylose.

Ces enzymes de branchement de l'amidon catalysent l'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -1,4 et leur transformation en liaisons glucosidiques α -1,6. Ces enzymes sont donc des enzymes de transfert, nommément des 1,4- α -D-glucan : 1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transférases.

Ces enzymes sont donc avantageusement utilisées dans les domaines d'application où il y a nécessité de disposer d'amidon ou de dérivés d'amidon présentant une structure plus ramifiée que celle des amidons ou des dérivés d'amidons standards, par exemple dans des applications où l'indigestibilité et/ou l'absence de tendance à la rétrogradation de l'amidon ou de ses dérivés sont recherchées.

Les enzymes de branchement de l'amidon sont d'une grande diversité. On les range habituellement en deux classes : les enzymes de branchement de l'amidon de type I et celles de type II.

Les enzymes de branchement de type I branchent les structures linéaires telles que l'amylose, à une vitesse plus élevée que l'amylopectine et elles transfèrent préférentiellement de longues chaînes glucosidiques (Degré

de Polymérisation ou D.P. moyen de ces chaînes compris entre 10 et 30).

5 A l'inverse, les enzymes de branchement de type II branchent les structures linéaires telles que l'amylose, à une vitesse plus basse que l'amylopectine et transfèrent préférentiellement de plus courtes chaînes glucosidiques (D.P. moyen compris entre 3 et 9, et notamment D.P. 6 et D.P. 7).

10 Les spécialistes dans le domaine de l'utilisation des enzymes de ramification s'accordent à dire que la préparation des enzymes de branchement de l'amidon à partir des plantes supérieures n'est réalisable industriellement qu'en ayant recours aux techniques de l'ADN recombinant, qui nécessitent cependant de mettre en oeuvre des travaux longs
15 et coûteux.

Dans ces conditions, il est souvent décidé d'entreprendre les recherches des enzymes de ramification dans le monde microbien où l'accessibilité auxdites enzymes est plus aisée qu'à partir des plantes supérieures.

20 On entend par monde microbien l'ensemble des micro-organismes vivants tels que notamment les bactéries, les levures, les moisissures et les algues unicellulaires.

Les enzymes de branchement que l'on peut isoler des bactéries ou des levures et qui sont capables de modifier
25 l'amidon et ses dérivés sont les enzymes de branchement qui participent à la synthèse d'un autre polymère de réserve, le glycogène. Ces enzymes de branchement du glycogène appartiennent au même groupe que les enzymes de branchement de l'amidon, même si leur spécificité d'action est
30 différente, et ce surtout en termes de longueur de chaînes glucosidiques transférées (D.P. moyen de 3 à 5).

Le brevet US 4 454 161 décrit par exemple une enzyme de branchement du glycogène isolée de *Bacillus megaterium*,

utilisée pour améliorer la qualité de l'amidon de différents aliments, en empêchant la tendance à la rétrogradation des structures préparées à partir de l'amidon et en augmentant leur indigestibilité et donc leurs propriétés de fibres alimentaires.

Le brevet EP 418 945 revendique également, pour la même application que celle mentionnée ci-dessus, l'utilisation d'une enzyme de branchement du glycogène thermostable et isolée de *Bacillus stearothermophilus*.

Cependant, si ces deux brevets montrent que l'on peut aisément produire et utiliser les enzymes de branchement du glycogène pour modifier l'amidon et ses dérivés, ce type d'enzyme est loin d'égaler la spécificité et la diversité d'actions des enzymes végétales de branchement de l'amidon. Ces enzymes ne répondent donc pas à la demande sans cesse croissante d'une plus grande variété de composés ramifiés nouveaux dans leurs structures et dans leurs propriétés.

Pour remédier aux inconvénients des enzymes de branchement du glycogène, une source avantageuse d'enzymes de ramification consiste en l'algue unicellulaire, qui accumule de l'amidon et possède donc, tout comme les plantes supérieures, des enzymes de branchement de l'amidon.

Les enzymes de branchement que l'on peut isoler des algues unicellulaires ont été décrites par FREDERICK (1973, Ann. N. Y. Acad. Sci., 210, 254-264), qui a été l'un des premiers à rapporter l'existence d'une enzyme Q dans l'algue *Chlorella pyrenoidosa*, enzyme capable de transférer sur l'amylose une distribution de longueur de chaînes glucosidiques caractéristique de l'amylopectine.

Cette enzyme a été purifiée à partir de gels de polyacrylamide dans lesquels on a fait migrer par électrophorèse toutes les enzymes extraites de cette algue.

Cependant, un tel procédé électrophorétique, relevant des techniques analytiques, ne peut en aucune manière conduire à l'obtention d'une quantité suffisante d'enzymes qui puisse permettre d'en envisager une application industrielle visant à transformer, en les branchant, de l'amidon ou ses dérivés.

Il est donc nécessaire d'avoir recours aux techniques classiques de purification des enzymes de branchement de l'amidon à partir des plantes supérieures, si l'on souhaite disposer de quantités plus importantes d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires.

Cependant, la mise en oeuvre des méthodes d'extraction et de purification des enzymes de branchement de l'amidon s'accompagne d'un certain nombre de difficultés, liées à la présence d'enzymes contaminantes qui perturbent, voire inhibent l'activité desdites enzymes de branchement.

Deux catégories d'enzymes contaminantes sont généralement décrites lors des procédés de purification des enzymes de branchement de l'amidon que l'on extrait à partir des plantes supérieures, enzymes contaminantes présentes également chez les algues unicellulaires.

Il s'agit des enzymes à activité amylasique et des enzymes à activité débranchante de l'amidon (principalement à activité de type isoamylase qui hydrolysent spécifiquement les liaisons α -1,6).

L'élimination des activités amylasiques contaminantes conditionne la stabilité des produits branchés que l'on obtient après avoir fait agir les enzymes de branchement sur les amidons ou ses dérivés. Sans cette précaution, les produits de branchement seraient partiellement ou totalement dégradés.

L'élimination des enzymes à activité amylasique est donc habituellement considérée comme la première opération

à réaliser en préalable à tout procédé de purification proprement dit.

Cette élimination des activités amylasiques est effectuée par séparation chromatographique, généralement par chromatographie échangeuse d'anions (Mac DONALD et PREISS, 5 1983, *Plant Physiol.*, 73, 175-178 et 1985, *Plant Physiol.*, 78, 849-852).

Les enzymes à activité débranchante constituent cependant le problème majeur rencontré pour l'isolement des 10 enzymes de branchement de l'amidon. En effet, ces enzymes débranchantes sont co-purifiées avec les enzymes de branchement de l'amidon, car elles possèdent des propriétés physico-chimiques voisines.

Dans ces conditions, pour préparer sélectivement les 15 enzymes de branchement de l'amidon, et quelle que soit la méthode de purification employée, il faut avoir recours à des conditions opératoires et des étapes de séparation chromatographique supplémentaires tout à fait particulières et lourdes, ce qui complique alors les procédés de 20 préparation des enzymes de branchement de l'amidon.

On constate donc que les procédés permettant de préparer les enzymes végétales de branchement de l'amidon décrits dans l'état de la technique présentent tous l'inconvénient de nécessiter de multiples étapes de 25 purification longues et fastidieuses.

Il résulte de ce qui précède qu'il y a donc nécessité de trouver un moyen permettant :

- de disposer d'une plus grande variété d'enzymes de branchement de l'amidon, afin de conduire à l'obtention 30 d'amidon et de dérivés d'amidon originaux tant dans leurs structures que dans leurs propriétés, ceci de manière à trouver de nouvelles applications à l'amidon et ses dérivés notamment en industrie alimentaire, et

- de préparer de manière simple, efficace et industrialisable ces enzymes de branchement de l'amidon.

La société Demanderesse a trouvé, après de nombreuses recherches, qu'un tel moyen pouvait consister en un procédé particulier de préparation d'enzymes de branchement de l'amidon à partir d'algues unicellulaires.

De manière plus précise, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires, caractérisé par le fait que l'on :

- a. modifie une algue unicellulaire de manière à ce qu'elle n'exprime plus d'activité débranchante de l'amidon,
- b. traite cette algue unicellulaire modifiée de manière à obtenir un extrait a-cellulaire concentré,
- c. effectue un tamisage moléculaire de cet extrait a-cellulaire concentré de manière à obtenir ledit mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

Le mélange d'enzymes de branchement de l'amidon selon l'invention est constitué de l'ensemble des enzymes de branchement de l'amidon de type I et de type II de l'algue unicellulaire.

La première étape du procédé conforme à l'invention consiste à modifier une algue unicellulaire de manière à ce qu'elle n'exprime plus d'activité débranchante de l'amidon.

Ce faisant, la société Demanderesse a vaincu un préjugé technique particulièrement fort, puisqu'il a toujours été recommandé d'éliminer en premier lieu les activités amylasiques contaminantes. En effet, ces activités enzymatiques gênent les mesures des activités de branchement de l'amidon effectuées dans les différentes fractions prélevées au cours des étapes de purification.

La société Demanderesse a cependant trouvé que l'utilisation d'algues unicellulaires se prêtait

avantageusement à une étape préalable d'élimination de l'activité débranchante de l'amidon, ce qui permet alors de séparer efficacement les enzymes de branchement des enzymes de débranchement de l'amidon.

5 La société Demanderesse a donc imaginé de modifier l'algue unicellulaire pour en éliminer l'activité enzymatique de débranchement de l'amidon plutôt que de mettre en oeuvre comme habituellement une étape de séparation chromatographique.

10 De manière préférentielle, on modifie l'algue unicellulaire par mutation, et plus particulièrement encore par mutation par insertion au locus du gène codant pour l'enzyme débranchante de l'amidon.

15 On entend par locus, la position sur le chromosome où est localisé le gène codant pour l'enzyme d'intérêt, en l'occurrence ici l'enzyme de débranchement de l'amidon.

20 La mutation par insertion, connue de l'homme du métier, consiste à favoriser l'intégration ponctuelle de fragments d'ADN dans le génome de l'algue unicellulaire. La sélection des mutants qui ne produisent plus d'amidon mais accumulent du phytoglycogène permet d'isoler les mutants d'insertion au locus codant pour l'enzyme débranchante de l'amidon.

25 On choisit comme algue unicellulaire, une algue de l'ordre de volvocales, préférentiellement de la famille des chlorophyceae et avantageusement l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. De manière encore plus préférentielle, on choisit une algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* dépourvue d'activité débranchante de l'amidon par mutation par insertion au niveau du locus *sta 7*.

30 La deuxième étape du procédé conforme à l'invention consiste à traiter cette algue unicellulaire modifiée de manière à obtenir un extrait a-cellulaire concentré.

Dans le cadre de la présente invention, l'extrait a-cellulaire est défini comme l'ensemble des protéines à activités enzymatiques ou non, qui seront extraites du concentrat d'algues unicellulaires.

5 On obtient cet extrait a-cellulaire en réalisant tout d'abord une culture de cette algue unicellulaire modifiée à grande échelle, de manière à obtenir une culture de densité cellulaire optimale.

10 Cette culture est à adapter à la physiologie de l'algue unicellulaire considérée, en termes de sources carbonées et azotées directement assimilables, de durée et de conduite de fermentation.

15 Pour l'algue mutante *Chlamydomonas reinhardtii*, on conduit la culture de préférence jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance.

20 On concentre ensuite la suspension cellulaire obtenue au terme de la culture précédente par le moyen d'un séparateur de cellules, par exemple par centrifugation ou filtration sur un support dont la porosité est adaptée à la taille des cellules collectées.

25 Pour l'algue mutante *Chlamydomonas reinhardtii*, on conduit par exemple cette étape de concentration par centrifugation de manière à atteindre une densité préférentiellement supérieure à 10^9 cellules/ml, valeur pour laquelle la société Demanderesse a obtenu le mélange d'enzymes de branchement de l'amidon avec le meilleur rendement.

30 L'extrait a-cellulaire est enfin obtenu à partir du concentrat d'algues unicellulaires par rupture des enveloppes membranaires des algues unicellulaires par toute méthode de lyse connue de l'homme du métier, notamment de manière mécanique, sonique, chimique ou enzymatique. Selon un mode préférentiel de réalisation conforme à l'invention,

on choisit d'effectuer une lyse mécanique, par exemple par le broyage des algues unicellulaires concentrées à la presse de FRENCH puis filtration pour éliminer les débris insolubles.

5 La troisième étape du procédé conforme à l'invention consiste à effectuer un tamisage moléculaire de cet extrait a-cellulaire concentré de manière à obtenir le mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

10 Cette étape de tamisage moléculaire peut consister avantageusement en une séparation chromatographique ou en une séparation sur membrane d'ultrafiltration, de préférence une séparation chromatographique sur gel filtration.

15 Préalablement à cette étape, il peut être avantageux d'éliminer les composés hydrophobes susceptibles de diminuer l'efficacité de l'étape de tamisage moléculaire. Ces composés hydrophobes sont principalement constitués par les pigments chlorophylliens de l'algue unicellulaire.

 Ce résultat est obtenu par exemple par précipitation ou par traitement chromatographique desdits pigments.

20 On choisit avantageusement, afin de limiter au maximum les étapes de séparations chromatographiques, la précipitation des pigments au polyéthylène glycol et préférentiellement, à la protamine sulfate.

25 L'étape de tamisage moléculaire permet de fractionner l'ensemble des protéines, à activités enzymatiques ou non, extraites du concentrat d'algues unicellulaires et de récupérer les fractions de poids moléculaires correspondant à la taille des enzymes de branchement de l'amidon, taille habituellement comprise entre 70 000 et 90 000 daltons.

30 Selon un mode préférentiel conforme à l'invention, on choisit une colonne de gel filtration dont le support présente une porosité qui permet de résoudre des protéines

dont la taille moléculaire est celle des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

Pour ce faire, on peut utiliser une colonne de gel filtration de type allyl-dextran-séphacryl, de gamme de fractionnement 1 000 à 100 000 daltons, qui conduit ainsi en
5 un seul passage à obtenir un mélange d'enzymes où les activités de branchement de l'amidon sont présentes dans les premières fractions d'élution.

La mesure des activités amylasiques, mais aussi celle
10 des activités de branchement de l'amidon, est effectuée dans chacune des fractions collectées.

De manière surprenante et inattendue, la société Demanderesse a constaté que l'on obtient ainsi, par la récupération des toutes premières fractions éluées, le
15 mélange des enzymes de branchement de l'amidon débarrassé également de tout ou grande partie des activités amylasiques.

Le procédé conforme à l'invention conduit en fait à une élution retardée des protéines à activités amylasiques au
20 bénéfice des enzymes à activités de branchement de l'amidon.

Toutes les fractions enrichies en activités de branchement, et débarrassées de tout ou grande partie des activités amylasiques sont finalement rassemblées et constituent le mélange d'enzymes de branchement de l'amidon
25 extraites d'algues unicellulaires conforme à l'invention.

De manière générale, on obtient ainsi en tant que produit nouveau, une composition enzymatique caractérisée en ce qu'elle contient un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon de type I et de type II extraites d'algues
30 unicellulaires et en ce qu'elle est significativement, voire totalement appauvrie en enzymes à activités amylasique et débranchante de l'amidon.

Les enzymes de branchement de l'amidon obtenues en mélange et contenues dans la composition enzymatique selon l'invention vont ensuite permettre d'effectuer la modification des amidons et/ou ses dérivés.

5 De manière préférentielle, on choisit de modifier une structure dérivée de l'amidon déjà branchée, et plus préférentiellement l'amylopectine.

La modification d'une structure polyglucosylée de type amylopectine est déterminée dans un premier temps par la mesure de la variation de la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe formé entre l'amylopectine modifiée et l'iode, par rapport à la longueur d'onde du témoin amylopectine non modifiée. Une variation de plus de 10nm traduit une modification significative de la structure de départ.

On mesure également la taille des chaînes glucosidiques transférées sur l'amylopectine en réalisant, *in vitro*, l'incubation de l'amylopectine avec le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues, son traitement à l'isoamylase de manière à cliver tous les points de branchement en O-1,6, et la détermination de la longueur des chaînes ainsi libérées par méthodes chromatographiques, par exemple par chromatographie anionique avec détection ampérométrique.

25 On réalise ensuite la comparaison des longueurs de chaînes ainsi obtenues avec celles libérées de l'amylopectine standard débranchée par la même technique, ce qui permet de caractériser l'amylopectine modifiée.

Les chromatogrammes obtenus par chromatographie anionique avec détection ampérométrique (DIONEX) indiquent habituellement une majorité de chaînes de D.P. 6, D.P. 7 et D.P. 8, avec très peu de D.P. 1 à D.P. 5 pour l'amylopectine

standard, alors que l'on obtient au contraire une majorité de chaînes de D.P. 1 à D.P. 5 pour l'amylopectine modifiée.

En regard des profils de distribution des longueurs de chaînes transférées par les enzymes de branchement de l'amidon des plantes supérieures (D.P. moyen de 10 à 30 pour les enzymes de branchement de l'amidon de type I et D.P. moyen de 6 à 7 pour les enzymes de branchement de l'amidon de type II), les produits obtenus après modification par le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues sont, à la connaissance de la société Demanderesse, nouveaux.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples non limitatifs décrits ci-dessous.

Exemple 1. Obtention d'une algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* dépourvue d'activités débranchantes de l'amidon.

La stratégie choisie repose sur l'introduction d'une mutation par insertion chromosomique de plasmide dans *Chlamydomonas reinhardtii*, en suivant le protocole établi par KINDLE et al., 1989, in *The Journ. Cell Biol.*, 109, 2589-2601.

Une souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii* sans paroi, défectueuse pour l'arginosuccinate lyase, est cultivée sur milieu HSA (E. HARRIS Ed., 1989, 25-63. Academic Press, San Diego, Calif.) complémenté en arginine à raison de 1 ml de solution à 100 mg/l d'arginine stérile par litre de culture. Les cultures sont stoppées en phase exponentielle de croissance, à la densité cellulaire de 2.10^6 cellules/ml et concentrées à 2.10^8 cellules/ml par centrifugation à 3 000 g pendant 10 min.

Dans un tube de 15 ml, 0,5 ml de cette suspension cellulaire sont mélangés avec 0,5 ml de billes de verre de

1 mm de diamètre et 10 µg d'ADN constitués par le plasmide pARG7.8, dans lequel a été introduit une séquence de 7,8 kbp issue du génome nucléaire de *Chlamydomonas reinhardtii* et codant pour l'argino-succinate lyase. Les tubes sont ensuite
5 agités vigoureusement pendant 1 min. Après ajout de 10 ml de milieu HSA complémenté en arginine, les cellules sont immédiatement transférées dans un second tube, pour éliminer les billes de verre.

Après centrifugation à 3 000 g pendant 10 min, les
10 cellules sont reprises dans 400 µl du milieu HSA et étalées sur milieu gélosé HSA sans arginine.

Les 15 000 transformants ainsi obtenus, devenus prototrophes pour l'arginine, sont ensuite criblés afin de trouver les souches déficientes pour la biosynthèse de
15 l'amidon. Après 5 jours de culture sur milieu gélosé carencé en azote, les colonies sont colorées par les vapeurs d'iode directement sur la boîte de Pétri. Les colonies sauvages apparaissant bleu-nuit, tous les autres transformants sont sélectionnés.

20 A l'issue de cette mutagenèse, les souches d'un phénotype nouveau sont isolées. Celles-ci présentent une production d'amidon réduite à moins de 0,1% de celle accumulée chez la souche sauvage. Ce phénotype original résulte de l'altération du gène *STA 7*, responsable de la
25 synthèse de l'activité débranchante de l'amidon.

Exemple 2. Culture de l'algue mutante et obtention de l'extrait a-cellulaire dépigmenté.

On cultive l'algue mutante en milieu HSA jusqu'à atteindre une densité cellulaire de 9.10^6 cellules/ml,
30 caractéristique de la phase stationnaire.

On inocule ensuite 10 litres de milieu HSA avec la culture précédente de manière à obtenir une densité cellulaire initiale de 5.10^4 cellules/ml, en maintenant une

agitation constante et sous lumière continue de 2 000 à 4 000 lux. Les cultures sont arrêtées lorsque leur concentration finale est de 4.10^6 cellules/ml. On concentre les algues unicellulaires à $4,5.10^9$ cellules/ml. Les
5 cellules ainsi récupérées sont lysées mécaniquement par deux passages à la presse de FRENCH à une pression de 7.10^7 Pa.

Les protéines de l'extrait sont dosées par la méthode de BRADFORD (Kit de dosage commercialisé par la société BIO-
10 RAD).

Les extraits a-cellulaires sont soumis à une précipitation des pigments par traitement à 50 µl/ml de protamine sulfate à 10 % pendant 15 mn dans la glace, puis centrifugés à nouveau à 10 000 g pendant 15 min à 4°C afin
15 de récupérer le surnageant. Pour amener le volume d'extrait à 2 ml, on précipite ledit surnageant au sulfate d'ammonium à 35 %. Sur les 287 mg de protéines totales obtenus dans l'extrait brut, les étapes de dépigmentation et de précipitation au sulfate d'ammonium ont conduit à récupérer
20 75 mg de protéines totales, et ont permis d'éliminer 50 % des protéines autres que les enzymes de branchement de l'amidon.

Exemple 3. Séparation chromatographique et préparation du mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites
25 d'algues.

Les 75 mg de protéines dans 2 ml d'échantillon sont déposés sur une colonne FPLC S100 / séphacryl 2,6 x 60 cm de PHARMACIA sur un support allyle dextran ponté par du N,N' méthylène bis-acrylamide en gel sphérique d'un diamètre de
30 25 à 75 µm caractérisé par sa gamme de fractionnement comprise entre 1 000 et 100 000 daltons.

Le débit de sortie de la colonne est fixé à 2 ml/min et des fractions de 2 ml sont récupérées par un collecteur de

fractions commercialisé par la société PHARMACIA. Le tampon d'élution utilisé est un tampon Acétate renfermant de l'acétate de sodium 50 mM et du dithiothreitol 10 mM, le pH étant ajusté à 6 par l'acide acétique.

5 On réalise le dosage des activités de branchement dans toutes les fractions collectées par la méthode de dosage indirecte à la phosphorylase A.

20 µl d'échantillons sont ajoutés à 180 µl d'un mélange réactionnel renfermant du citrate de sodium 250 mM à pH 7,
10 de l'adénosine 5' monophosphate 1 mM, de la phosphorylase A de muscle de lapin à 0,2 µg/µl, du glucose-1-phosphate 45 mM et du [U-14C] glucose-1-phosphate à 3,8 µM (dont la radioactivité spécifique est de $10,5 \cdot 10^9$ Bq/mmol).

Après une heure à 30°C, la réaction est arrêtée par
15 ajout de 800 µl d'acide trichloroacétique 10 %. Les précipités, après une nuit à 4°C, sont filtrés sur papier WHATMAN de porosité 1 µm, rincés par 5 ml d'acide trichloroacétique 5%, par 5 ml d'eau, et enfin par 5 ml d'éthanol à 70 %. Le comptage radioactif est réalisé par un
20 compteur BECKMAN après avoir placé les filtres dans des fioles de comptage contenant 3 ml de liquide scintillant.

Une unité d'enzyme de branchement se définit dans de telles conditions comme une nanomole de glucose-1-phosphate incorporée par minute.

25 On réalise ensuite le dosage des activités amylasiques sur chaque fraction. 100 µl de chaque fraction vont être soumis à une dénaturation des protéines à 100°C pendant 5 mn en présence de sodium dodécyl-sulfate 1% et mercaptoéthanol 5% dans un volume final de 115 µl, puis déposés sur un gel
30 de polyacrylamide (30/1 de acrylamide/bis-acrylamide) à 7,5 % , tris HCl 250 mM pH 8,8 et SDS 0,1 %, contenant 0,3 % d'amidon soluble de pomme de terre pour l'analyse en suivant la technique dite du zymogramme amidon.

Les activités hydrolytiques vont entraîner une hydrolyse locale de l'amidon contenu dans le gel et sont visualisées après migration (électrophorèse de 70 mn à 15 V cm⁻¹ ; température ambiante; tampon : tris-glycine 25 mM pH 8,3 , dithiothreitol 1 mM, sodium dodécyl-sulfate 0,1 %), renaturation (2 heures sous agitation lente; température ambiante; tampon tris 40 mM), incubation (une nuit sous agitation lente à température ambiante en tampon tris-glycine 25 mM à pH 8,3 et dithiothreitol 20 mM) et enfin coloration à l'iode.

La couleur des dextrines résiduelles engendrée par l'action de ces enzymes renseigne sur la nature de l'activité enzymatique détectée.

Les 8 premières fractions, représentant 16 ml, pour lesquelles l'activité des enzymes de branchement est optimale (de l'ordre de 17 340 unités d'activité de branchement), et les activités amylasiques minimales (peu ou pas d'activité amylasique visualisée sur gel) constitueront le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites de l'algue.

Exemple 4. Modification de l'amylopectine de maïs par le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites de l'algue.

On réalise d'abord l'estimation des activités branchantes de l'amidon du mélange des enzymes d'algues, par la mesure de la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe formé par l'amylopectine modifié avec l'iode. 300 µl de mélange d'enzymes contenant 131 unités d'activité de branchement sont ajoutés à 10 µl d'une solution à 15 µg/µl d'amylopectine commerciale de maïs obtenue par dissolution de 225 mg dans 12 ml de diméthylsulfoxyde 90 % pendant 10 mn à 100°C, suivi de la précipitation par 36 ml d'éthanol une nuit à 4°C, centrifugation 15 mn à 4 000 g et resuspension

dans 15 ml d'eau, le pH étant ajusté à 7 pour favoriser les réactions de branchement).

Après incubation une nuit à 30°C, le produit branché est précipité par 3 volumes d'éthanol durant 12h à 4°C puis
5 il est centrifugé à 10 000 g pendant 15 mn à 4°C.

Un spectre d'absorption entre 400 et 700 nm est réalisé à partir du produit branché qui est redissout dans 100 µl de soude 0,01 N puis 60 µl de cette solution est mélangé à 400 µl d'iode 1X (0,0025% de I₂ ; 0,25 % de IK).

10 La longueur d'onde du complexe amylopectine de maïs avec l'iode est de 530 nm, et celui du complexe amylopectine de maïs modifiée par le mélange d'enzymes de branchement d'amidon extraites d'algues avec l'iode est de 505 nm. La différence de 25 nm traduit bien une modification
15 significative de l'amylopectine et l'apparition de nouveaux branchements de cette structure.

La détermination des longueurs de chaînes résultantes du traitement de l'amylopectine par le mélange des enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues a été
20 effectuée comme suit : 17,6 mg d'amylopectine sont incubés avec 17000 unités d'activités de branchement dans un volume de 21 ml, ajusté à pH 7,5. Après une incubation pendant 6 h. à 30°C, le produit branché est précipité par 3 volumes d'éthanol durant une nuit à 4°C puis il est centrifugé à
25 10000 g pendant 15 mn à 4°C.

17,6 mg d'amylopectine ainsi modifiée sont repris dans 1,1 ml d'eau et agités vigoureusement, puis on ajoute 0,17 ml de DMSO et porte le mélange à 100°C dans un tube à hydrolyse au bain-marie REACTI-THERM, avec agitation, sans
30 vide, pendant 6 min.

On place ensuite le tube à hydrolyse dans un autre bain-marie REACTI-THERM, avec agitation, à une température de 45°C, puis, après stabilisation à cette température, on

ajoute 0,08 ml de tampon acétate de sodium 1N, amené à pH 3,5 avec de l'acide acétique. On ajoute 5 µl d'isoamylase à 59000 U/ml (enzyme isolée de *Pseudomonas amyloclavata* de HAYASHIBARA) et on incube à 45°C pendant 2h30. On arrête ensuite la réaction en portant le milieu réactionnel à 100°C pendant 3 min.

On réalise en parallèle une opération identique sur 17,6 mg d'amylopectine non modifiée, ce qui constitue le témoin de la réaction.

Les résultats obtenus par chromatographie anionique avec détection ampérométrique (DIONEX) indiquent une majorité de chaînes de D.P. 6, D.P. 7 et D. P. 8, avec très peu de D.P. 1 à D.P. 5 pour l'amylopectine standard, tandis que les résultats correspondant à l'amylopectine modifiée indiquent au contraire une majorité de chaînes de D.P. 1 à D.P. 5, ce qui traduit une redistribution des longueurs de chaînes glucosidiques.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires caractérisé par le fait que l'on :

5 a. modifie une algue unicellulaire de manière à ce qu'elle n'exprime plus d'activité débranchante de l'amidon,

 b. traite cette algue unicellulaire modifiée de manière à obtenir un extrait a-cellulaire concentré,

10 c. effectue un tamisage moléculaire de cet extrait a-cellulaire concentré de manière à obtenir ledit mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on conduit l'étape a en modifiant l'algue unicellulaire par une technique de mutation par insertion.

15 3. Procédé selon l'une ou l'autre des revendications 1 et 2, caractérisé par le fait que l'on conduit l'étape b en effectuant une lyse de l'algue unicellulaire de manière mécanique, sonique, chimique ou enzymatique, de préférence de manière mécanique.

20 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que l'on conduit l'étape c en effectuant un tamisage moléculaire par une technique de séparation chromatographique ou de séparation sur membrane d'ultrafiltration , de préférence par une technique de
25 séparation chromatographique sur gel filtration.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par le fait que l'algue unicellulaire est l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.

30 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* est dépourvue d'activité débranchante de l'amidon par mutation par insertion au niveau du locus *sta7* .

7. Composition enzymatique caractérisée en ce qu'elle contient un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon de type I et de type II extraites d'algues unicellulaires et en ce qu'elle est significativement, voire totalement appauvrie en enzymes à activités amylasique et débranchante de l'amidon

8. Procédé de modification de l'amidon et de ses dérivés, caractérisé par le fait que l'on fait agir sur l'amidon et/ou sur l'un au moins de ses dérivés un mélange d'enzymes de branchement de l'amidon extraites d'algues unicellulaires obtenu par la mise en oeuvre d'un procédé conforme à l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou une composition enzymatique conforme à la revendication 7.

9. Amidons et dérivés d'amidon modifiés susceptibles d'être obtenus par la mise en oeuvre d'un procédé conforme à la revendication 8.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02261

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/10 C12P19/18 C12N1/13 //(C12N9/10,C12R1:89)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FONTAINE T ET AL: "Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that Chlamydomonas soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 268, no. 22, 5 August 1993 (1993-08-05), pages 16223-16230, XP002108225 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 abstract page 16224, column 1 page 16228, column 2 figure 5</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 1999

Date of mailing of the international search report

02/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02261

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOUILLE G ET AL: "Preamylopectin processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants" PLANT CELL., vol. 8, August 1996 (1996-08), pages 1353-1366, XP002108226 AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD., US ISSN: 1040-4651 the whole document ---</p>	1-7
A	<p>DEL RUE B ET AL: "WAXY CHLAMYDOMONAS REINHARDTII: MONOCELLULAR ALGAL MUTANTS DEFECTIVE IN AMYLOSE BIOSYNTHESIS AND GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE ACTIVITY ACCUMULATE A STRUCTURALLY MODIFIED AMYLOPECTIN" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 174, no. 11, 1 June 1992 (1992-06-01), pages 3612-3620, XP000673929 ISSN: 0021-9193 abstract page 3613, column 2, line 3 - line 4 ---</p>	1-7
A	<p>EP 0 418 945 A (AVEBE COOP VERKOOP PROD) 27 March 1991 (1991-03-27) cited in the application the whole document -----</p>	8,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02261

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0418945 A	27-03-1991	NL 8902128 A	18-03-1991
		AT 113982 T	15-11-1994
		DE 69014046 D	15-12-1994
		DE 69014046 T	23-03-1995
		DK 418945 T	05-12-1994

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. de Recherche Internationale No
PCT/FR 99/02261

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N9/10 C12P19/18 C12N1/13 //(C12N9/10,C12R1:89)		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C12P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FONTAINE T ET AL: "Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that Chlamydomonas soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 268, no. 22, 5 août 1993 (1993-08-05), pages 16223-16230, XP002108225 AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD., US ISSN: 0021-9258 abrégé page 16224, colonne 1 page 16228, colonne 2 figure 5 --- -/--	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 25 novembre 1999		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 02/12/1999
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Lejeune, R

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Mondiale de la Propriété Industrielle

PCT/FR 99/02261

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOUILLE G ET AL: "Preamylopectin processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants" PLANT CELL., vol. 8, août 1996 (1996-08), pages 1353-1366, XP002108226 AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD., US ISSN: 1040-4651 le document en entier -----</p>	1-7
A	<p>DEL RUE B ET AL: "WAXY CHLAMYDOMONAS REINHARDTII: MONOCELLULAR ALGAL MUTANTS DEFECTIVE IN AMYLOSE BIOSYNTHESIS AND GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE ACTIVITY ACCUMULATE A STRUCTURALLY MODIFIED AMYLOPECTIN" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 174, no. 11, 1 juin 1992 (1992-06-01), pages 3612-3620, XP000673929 ISSN: 0021-9193 abrégé page 3613, colonne 2, ligne 3 - ligne 4 -----</p>	1-7
A	<p>EP 0 418 945 A (AVEBE COOP VERKOOP PROD) 27 mars 1991 (1991-03-27) cité dans la demande le document en entier -----</p>	8,9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation Mondiale de l'Intellectuel No

PCT/FR 99/02261

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0418945 A	27-03-1991	NL 8902128 A	18-03-1991
		AT 113982 T	15-11-1994
		DE 69014046 D	15-12-1994
		DE 69014046 T	23-03-1995
		DK 418945 T	05-12-1994
